

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

51

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Int. Cl.:

C 07 g, 7/02

C 11 d, 7/42

DEUTSCHES PATENTAMT



52

Deutsche Kl.:

6 a, 22/10

23 e, 2

10

11

21

22

43

# Offenlegungsschrift 2 109 881

Aktenzeichen: P 21 09 881.7

Anmeldetag: 2. März 1971

Offenlegungstag: 23. September 1971

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 3. März 1970

33

Land: Großbritannien

31

Aktenzeichen: 10240-70

54

Bezeichnung: Enzympräparat

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N. V.,  
Delft (Niederlande)

Vertreter gem. § 16 PatG: Jung, E., Dr.-Chem. Dr. phil.; Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.;  
Schirdewahn, J., Dipl.-Phys. Dr. rer. nat.; Patentanwälte,  
8000 München

72

Als Erfinder benannt: Antrag auf Nichtnennung

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): —

DT 2109881

DIPL.-CHEM. DR. ELISABETH JUNG  
DIPL.-CHEM. DR. VOLKER VOSSIUS  
DIPL.-PHYS. DR. JURGEN SCHIRDEWAHN  
PATENTANWÄLTE

2. März 1971  
8 MÜNCHEN 23.  
CLEMENSSTRASSE 30  
TELEFON 345067  
TELEGRAMM-ADRESSE: INVENT/MÜNCHEN  
TELEX 5-29686

2109881

u.Z.: F 933 C (Vo/kä)

DUI - 1145

KONINKLIJKE NEDERLANDSCHE GIST- EN SPIRITUSFABRIEK N.V.

Delft, Niederlande

---

" Enzympräparat "

---

Priorität: 3. März 1970, Grossbritannien, Nr. 10 240/70

---

Die Erfindung betrifft Enzympräparate mit ausgezeichneten Eigenschaften zur Verwendung in Waschmitteln.

Die Herstellung von Enzymen, die insbesondere für Waschmittel verwendet werden sollen, ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden. So ist es z.B. schwierig, das Enzym in solcher Reinheit herzustellen, dass es dem Waschmittel keinen unangenehmen Geruch verleiht. Ferner hat das Enzym eine Farbe, die bei der Einverleibung des Enzyms im Waschmittel diese weniger ansprechend macht.

Aufgabe der Erfindung war es daher, Enzympräparate zu schaffen, die nicht die vorgenannten Nachteile aufweisen und ausserdem eine hohe Stabilität besitzen, so dass sie trotz Verwendung in geringer Menge eine bestimmte Wirkung entfalten und für die Gesundheit weniger Gefahren bestehen als bei den üblichen Enzym-

109839/1549

präparaten. Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Enzympräparat, enthaltend einen Komplex aus einem Enzym und einem in wässrig-alkalischer Lösung löslichen Polymer mit einer unverzweigten oder verzweigten C-C-Kette mit Carboxylgruppen als Substituenten und mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von mindestens 10 000, wobei das Polymer gegebenenfalls als weitere Substituenten gegebenenfalls substituierte Kohlenwasserstoffreste enthalten kann und die C-C-Kette und bzw. oder die Kohlenwasserstoffreste gegebenenfalls durch Heteroatome, vorzugsweise Sauerstoffatome, unterbrochen sein können.

Vorzugsweise hat das Polymer ein Durchschnittsmolekulargewicht von mindestens 20 000. Die bevorzugten Polymere und Copolymere enthalten  $-\text{CHXCY}(\text{COOH})-$ Gruppen, in denen X ein Wasserstoffatom oder eine Carboxylgruppe und Y ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe bedeuten. Beispiele für derartige Polymere sind die Polymeren von Acrylsäure oder Methacrylsäure oder Copolymerisate von Acrylsäure, Methacrylsäure oder Maleinsäure mit z.B. Styrol, Äthylen oder Vinylmethyläther. Ferner sind auch partielle niedere Alkylester und partielle Amide dieser Polymeren und Copolymeren geeignet.

Die Komplexe der Erfindung sind verhältnismässig rein, sie haben einen angenehmeren Geruch und eine bessere Farbe sowie eine höhere Aktivität, bezogen auf Gewichtsbasis, als die herkömmlichen Enzyme. Überraschenderweise gehen diese günstigen Eigenschaften nicht verloren bzw. werden nicht beeinträchtigt, wenn man das Enzympräparat Waschmitteln einverleibt. Ein weiterer

109839/1549

Vorteil der Enzympräparate der Erfindung gegenüber den herkömmlichen Enzymen ist ihre geringere Toxizität sowie die geringere Gefahr allergener Reaktionen und ihre hohe Stabilität.

Waschmittel, die ein Enzympräparat der Erfindung enthalten, besitzen zumindest vergleichbare Waschwirkung wie Waschmittel, die ein übliches Enzym gleicher enzymatischer Aktivität, ausgedrückt in Delft-Einheiten (DU) enthalten. Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist darin zu erblicken, dass die Enzymkomplexe aus der filtrierten Gärmaische bzw. dem Zellextrakt hergestellt werden können, wodurch die übliche Isolierung des Enzyms entfällt.

Die Enzyme für die Enzympräparate der Erfindung leiten sich von Enzymen ab, wie sie üblicherweise in Waschmitteln verwendet werden, z.B. Proteasen, wie sie z.B. durch Bacillusarten erzeugt werden. Diese Proteasen oder deren Gemische können vor der Herstellung des Enzympräparates oder danach mit Amylasen, Lipasen oder ähnlichen Enzymen vermischt werden. Die Erfindung betrifft ferner Komplexe mit anderen Enzymen, die im allgemeinen nicht in Waschmitteln verwendet werden, wie spezielle Arten von Amylasen, Lipasen, Alkoholdehydrasen und Carboxylasen.

Eine besonders vorteilhafte Gruppe unter den Enzymkomplexen der Erfindung ist diejenige, in der das Enzym mit einem Polymer kombiniert ist, dessen C-C-Kette lediglich Kohlenwasserstoffreste, insbesondere Arylreste, als Substituenten neben den Carboxylgruppen enthält. Beispiele für derartige Polymere sind solche, die Maleinsäure als Monomereinheit enthalten. Die Arylreste in diesen Polymeren leiten sich z.B. von Monocaryl-

äthyleneinheiten, insbesondere Styroleinheiten, ab. Vorzugsweise besteht das Polymer aus Maleinsäure- und Styroleinheiten. Das bevorzugte Mengenverhältnis der Maleinsäure- und Styroleinheiten beträgt etwa 3 : 1 bis 1 : 3, insbesondere 3 : 2 bis 2 : 3. Ein besonders geeignetes Polymer ist im Handel als wässrige Lösung unter dem Namen G-942 erhältlich, in der das Molverhältnis der Styroleinheiten zu den Maleinsäureeinheiten etwa 1 : 1 und das Durchschnittsmolekulargewicht mehr als 10 000 beträgt. Andere geeignete Monomereinheiten für die in den Enzympräparaten der Erfindung verwendeten Polymeren sind z.B. Acrylsäure und Methacrylsäure. Diese Monomeren können selbstverständlich auch in Copolymerisaten vorhanden sein, in denen gleichzeitig z.B. Styroleinheiten anwesend sind; vergl. USA.-Patentschrift 2 205 882 und 2 205 901. In diesen Patentschriften sind Beispiele für Polymere genannt, die für die Enzympräparate der Erfindung geeignet sind.

Die in den Polymeren vorhandenen Carboxylgruppen können teilweise in Derivate, wie Amide oder Ester, umgewandelt sein. Für die Ester kommen als Alkoholkomponente vorzugsweise niedere aliphatische Alkohole in Frage. Einige Carboxylgruppen sollen im Polymer in freier Form vorliegen. Die Erfindung betrifft auch Produkte, die bei der Umsetzung der Komplexe bzw. Enzympräparate der Erfindung mit Metallionen enthaltenden Lösungen oder Reaktionsteilnehmern anfallen, die mit diesen freien Carboxylgruppen des Polymers reagieren und eine Ausfällung und bzw. oder Vernetzung der gebildeten Verbindung hervorrufen.

109839/1549

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der Enzympräparate, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine wässrige Lösung des Enzyms mit einer wässrigen Lösung des Polymers zusammenbringt. Vor oder nach dem Vermischen wird der  $p_H$ -Wert auf etwa 2 bis etwa 9, vorzugsweise etwa 2 bis etwa 6, eingestellt. Die gebildete Fällung wird nach üblichen Methoden abgetrennt, z.B. durch Abschleudern und Waschen und Trocknen des ausgefällten Enzympräparats. Zum Waschen des Enzympräparats sollen solche Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische verwendet werden, die das Enzympräparat nicht nennenswert lösen oder zersetzen. Zu diesem Zweck eignen sich z.B. organische Lösungsmittel, wie Aceton und Äthanol. Die getrocknete Fällung kann als freifliessendes Pulver erhalten werden, die sich Waschmitteln leicht einverleiben lässt.

Die Polymermengen zur Herstellung des Enzymkomplexes hängen von der Art des Enzyms und seiner Konzentration sowie der Art des verwendeten Polymers ab. Weitere Faktoren sind z.B. der  $p_H$ -Wert, die Gegenwart von Salzen, die elektrostatischen Ladungen des Enzyms und des Polymers, die die Komplexbildung beeinflussen. Auch die Menge des Polymers, die zur optimalen Komplexbildung erforderlich ist, hängt von diesen und anderen Faktoren ab, z.B. der Konzentration der Enzymlösung. Bei Verwendung einer G-942-Lösung, die etwa 25 % des Styrol-Maleinsäure-Copolymerisats enthält, werden vorzugsweise Mengen von etwa 0,5 bis 3 Gewichtsprozent pro Volumen der durch Bazillusarten erzeugten Protease ( MAXATASE ), bezogen auf eine Enzymlösung von etwa 100 000 DU/g, verwendet. Für Spezialzwecke können auch andere

Mengen verwendet werden.

Die Enzympräparate der Erfindung können vorzugsweise nach dem Waschen mit Metallionen oder anderen Reaktionsteilnehmern umgesetzt werden. Geeignete Metallionen sind dreiwertige Metallionen, wie Aluminium-, Eisen- und Chromionen. Es können auch Metallionen mit anderer Wertigkeit, z.B. Zirkoniumionen, verwendet werden.

Die Erfindung betrifft schließlich Waschmittel, die einen oder mehrere der vorgenannten Enzymkomplexe zusammen mit mindestens einer waschaktiven Substanz enthalten. In den Waschmitteln ist der Enzymkomplex in ausreichender Menge vorhanden, um eine gute enzymatische Aktivität zu erhalten. Die bevorzugte enzymatische Aktivität in den Waschmitteln der Erfindung beträgt etwa 1000 bis etwa 3000 DU/g.

In den Waschmitteln der Erfindung werden die üblichen bekannten waschaktiven Substanzen verwendet, die in biologisch aktiven Waschmitteln verwendet werden. Im allgemeinen können nicht-ionische und anionische grenzflächenaktive Verbindungen verwendet werden, wie wasserlösliche Seifen, anionische, nichtionische, ampholytische und zwitterionische Netzmittel.

Beispiele für die wasserlöslichen Seifen sind die Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Alkanolammoniumsalze, z.B. die Mono-, Di- und Triäthanolammoniumsalze höherer Fettsäuren mit etwa 10 bis 22 C-Atomen. Spezielle Beispiele für diese Klasse von Netzmitteln sind die Natrium- oder Kaliumsalze von Fettsäuregemischen, die sich von Kokosnussöl und Talg ableiten.

109839/1549

Beispiele für anionische Netzmittel sind die wasserlöslichen Salze, z.B. die Alkalimetallsalze organischer Schwefelsäurereaktionsprodukte, die in ihrem Molekül einen Alkylrest mit etwa 8 bis etwa 22 C-Atomen, und Sulfonat- oder Sulfatreste enthalten. Der Ausdruck Alkylrest schliesst auch den Alkylrest höherer Acylreste ein. Spezielle Beispiele für diese Klasse von Netzmitteln sind die Natrium- oder Kaliumalkylsulfate, wie insbesondere solche Verbindungen, die durch Sulfatierung höherer Alkohole mit 8 bis 18 C-Atomen erhalten werden und die ihrerseits bei der Reduktion der Glyceride von Talg oder Kokosnussöl anfallen. Ferner Natrium- oder Kaliumbenzolsulfonate, in denen der Alkylrest unverzweigt oder verzweigt ist und etwa 9 bis etwa 15 C-Atome enthält, wie Natriumdodecylbenzolsulfonat, Natriumalkylglyceryläthersulfonate, insbesondere die Äther höherer Alkohole, die sich von Talg und Kokosnussöl ableiten, Natrium-Kokosnussölfettsäuremonoglyceridsulfate und -sulfonate, Natrium- oder Kaliumsalze von Schwefelsäureestern des Reaktionsproduktes aus 1 Mol eines höheren Fettalkohols, wie Talg- oder Kokosnussölalkoholen, und etwa 1 bis 6 Mol Äthylenoxid, Natrium- oder Kaliumsalze von Alkylphenoläthylenoxidäthersulfaten mit etwa 1 bis etwa 10 Äthylenoxideinheiten im Molekül und etwa 8 bis etwa 12 C-Atomen in den Alkylresten, die Reaktionsprodukte von Fettsäuren, die mit Isäthionsäure verestert und mit Natriumhydroxid neutralisiert sind, bei denen sich die Fettsäuren z.B. von Kokosnussöl ableiten, Natrium- oder Kaliumsalze von Fettsäureamiden eines Methyltaurids, in denen die Fettsäuren sich z.B. von Kokosnussöl ableiten, sowie die Natrium- und Kaliumsalze von sulfonierten C<sub>10</sub>-bis C<sub>24</sub>-

109839/1549

Olefinen.

Beispiele für nichtionische Netzmittel sind die Kondensationsprodukte von Alkylenoxiden mit organischen hydrophoben Verbindungen, die aliphatischer oder alkyларomatischer Art sein können. Die Länge der Polyoxyalkylenreste, die mit einer hydrophoben Gruppe kondensiert sein kann, lässt sich so einstellen, dass wasserlösliche Verbindungen mit dem gewünschten HLB-Wert erhalten werden. Eine andere Klasse dieser Netzmittel hat halbpolarer Charakter. Spezielle Beispiele für diese Klasse nicht-ionischer Netzmittel sind:

1) Die unter der Bezeichnung "Pluronic" bekannten nichtionischen Netzmittel. Diese Verbindungen werden durch Kondensation von Äthylenoxid mit einer hydrophoben Base hergestellt, die durch Kondensation von Propylenoxid mit Propylenglykol erhalten wird. Der hydrophobe Teil des Moleküls, der wasserunlöslich ist, hat ein Molekulargewicht von etwa 1500 bis 1800. Durch Anlagerung von Polyoxyäthylenresten an diesen hydrophoben Teil wird die Wasserlöslichkeit des Moleküls insgesamt erhöht und der flüssige Charakter des Produktes bis zu dem Punkt beibehalten, bei dem der Polyoxyäthylengehalt etwa 50 % des Gesamtgewichtes des Kondensationsproduktes ausmacht.

2) Die Polyoxyäthylenoxidkondensate von Alkylphenolen, z.B. die Kondensationsprodukte von Alkylphenolen mit etwa 6 bis 12 C-Atomen in dem unverzweigten oder verzweigten Alkylrest mit Äthylenoxid. Das Äthylenoxid liegt in Mengen von 5 bis 25 Mol je Mol Alkylphenol vor. Der Alkylrest dieser Verbindung kann sich von Oligomeren des Propylens, Diisobutens, Octens oder Nonens

109839/1549

ableiten.

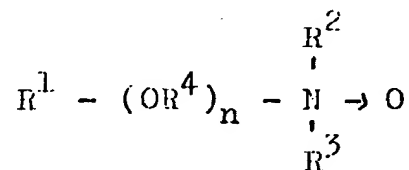
3) Kondensationsprodukte von Äthylenoxid mit dem Umsetzungsprodukt von Propylenoxid und Äthylendiamin. Beispiele hierfür sind Verbindungen, die etwa 40 bis etwa 80 Gewichtsprozent Äthylenoxideinheiten enthalten und ein Molekulargewicht von etwa 5000 bis etwa 11 000 haben und deren hydrophobe Base das Umsetzungsprodukt von Äthylendiamin mit überschüssigem Propylenoxid ist,

die ein Molekulargewicht der Größenordnung von 2500 bis 3000 hat.

4) Kondensationsprodukte unverzweigter oder verzweigter aliphatischer Alkohole mit 8 bis 22 C-Atomen mit Äthylenoxid, z.B. Kokosnussalkohol-äthylenoxid-Kondensate mit 5 bis 30 Äthylenoxideinheiten und 10 bis 14 C-Atomen im Kokosnussalkoholteil.

5) Die Säureamide von Fettsäuren mit etwa 8 bis 18 C-Atomen mit Ammoniak, Monoäthanolamin und Diäthanolamin. Die Acylreste leiten sich im allgemeinen von natürlich vorkommenden Glyceriden, wie Kokosnussöl, Palmöl, Sojabohnenöl und Talg ab. Sie können jedoch auch synthetischen Ursprungs sein, z.B. durch Oxydation von Erdöl oder durch Hydrierung von Kohlenmonoxid nach dem Fischer-Tropsch-Verfahren anfallen.

6) Langkettige tertiäre Aminoxide der allgemeinen Formel

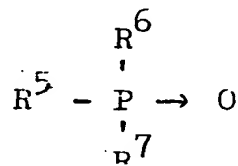


in der  $R^1$  ein Alkylrest mit etwa 8 bis etwa 24 C-Atomen,  $R^2$  und  $R^3$  Methyl-, Äthyl- oder Hydroxyäthylgruppen und  $R^4$  eine

Äthylengruppe ist und n einen Wert von 0 bis etwa 10 hat.

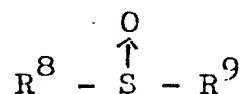
Spezielle Beispiele für diese Verbindungen sind Dimethyldodecylaminoxid und Bis-(2-hydroxyäthyl)-dodecylaminoxid.

7) Langkettige tertiäre Phosphinoxide der allgemeinen Formel



in der  $\text{R}^5$  ein Alkyl-, Alkenyl- oder Monohydroxyalkylrest mit 10 bis 24 C-Atomen in der Kette und  $\text{R}^6$  und  $\text{R}^7$  Alkyl- oder Monohydroxyalkylreste mit 1 bis 3 C-Atomen sind. Beispiele für diese Verbindungen sind Dimethyldodecylphosphinoxid und Dimethyl-(2-hydroxydodecyl)-phosphinoxid.

8) Langkettige Sulfoxide der allgemeinen Formel



in der  $\text{R}^8$  ein Alkylrest mit etwa 10 bis etwa 18 C-Atomen und  $\text{R}^9$  ein Alkylrest mit 1 bis 3 C-Atomen und 1 bis 2 Hydroxylgruppen ist. Spezielle Beispiele für diese Verbindungen sind Dodecylmethylsulfoxid und 3-Hydroxytridecylmethylsulfoxid.

Beispiele für ampholytische Netzmittel sind Derivate aliphatischer sekundärer und tertiärer Amine, in denen der Alkylrest unverzweigt oder verzweigt ist und in denen einer der aliphatischen Reste etwa 8 bis 18 C-Atome enthält und ein Rest eine anionische, wasserlöslich machende Gruppe, z.B. eine Carboxyl-, Sulfo-, Sulfato-, Phosphato- oder Phosphonogruppe enthält. Beispiele für diese Verbindungen sind Natrium-3-dodecylamino-

propionat und Natrium-3-dodecylaminopropansulfonat.

Beispiele für zwitterionische Netzmittel sind die Derivate aliphatischer quartärer Ammonium-, Phosphonium- und Sulfoniumverbindungen, in denen der Alkylrest unverzweigt oder verzweigt ist und in denen einer der aliphatischen Reste etwa 8 bis 24 C-Atome enthält und einer der Reste eine anionische, wasserlöslich machende Gruppe enthält, z.B. eine Carboxyl-, Sulfo-, Sulfato-, Phosphato- oder Phosphonogruppe. Beispiele für diese Verbindungen sind 3-(N,N-Dimethyl-N-hexadecylammonio)-propan-1-sulfonat und 3-(N,N-Dimethyl-N-hexadecylammonio)-2-hydroxypropan-1-sulfonat. Diese Verbindungen sind wegen ihrer Kaltwasser-Netzmittелеigenschaften bevorzugt.

Die vorgenannten Netzmittel können allein oder im Gemisch verwendet werden. Bei der vorstehenden Aufzählung handelt es sich lediglich um Beispiele für die zahlreichen Netzmittel, die für die Waschmittel der Erfindung in Frage kommen. Es können auch andere organische Verbindungen mit Netzmittелеigenschaften verwendet werden. Gewöhnlich sind die waschaktiven Substanzen in Mengen von etwa 4 bis etwa 20 % des Waschmittels vorhanden.

Die Waschmittel der Erfindung können auch weitere übliche Zusätze enthalten, wie komplexe Phosphate, z.B. Natriumtripyrophosphat und Natriumpyrophosphat, die vorzugsweise in Mengen von etwa 40 bis 50 Gewichtsprozent des Waschmittels verwendet werden. Ferner können solche Verbindungen verwendet werden, wie Natrium-cyantriacetat und Natriumcitrat. Die wichtigste Wirkung

109839/1549

dieser Verbindungen besteht in der Weichmachung des Wassers. Andere Zusätze sind z.B. wasserfreies Natriumsilikat, gewöhnlich in Mengen von 1 bis 10 Gewichtsprozent, schwach alkalische Verbindungen, wie Natriumbicarbonat, gewöhnlich in Mengen bis zu 20 Gewichtsprozent, Füllstoffe, wie Natriumsulfat, und andere Verbindungen, wie Carboxymethylcellulose, Parfüme und optische Aufheller. Die Waschmittel können in üblicher Weise hergestellt werden, z.B. durch Mischen der Bestandteile oder durch Herstellung einer Vormischung, die anschliessend mit den weiteren Bestandteilen vermischt wird. Vorzugsweise wird das Enzympräparat der Erfindung oder sein Umsetzungsprodukt mit Metallionen oder ähnlichen Reaktionsteilnehmern mit einer oder mehreren der anderen Verbindungen gemischt, z.B. dem Füllstoff, der gewöhnlich Natriumsulfat ist. Auf diese Weise wird zunächst ein Konzentrat mit bestimmter Enzymaktivität hergestellt, das anschliessend mit den anderen Bestandteilen vermischt werden kann.

Die Enzymaktivität wird folgendermassen bestimmt. Die Aktivität eines Enzyms wird in Einheiten angegeben. Eine Einheit des Enzyms ist diejenige Menge des Enzyms, die eine bestimmte chemische Umsetzung innerhalb einer bestimmten Zeit durchführt. Die Reaktionsbedingungen beeinflussen die Bestimmung der Aktivität erheblich. Die Aktivität wird vorzugsweise unter solchen Bedingungen bestimmt, wie sie in Waschlaugen vorliegen, da einige Proteasen in Waschpulvern verwendet werden. Aus diesen Gründen wird die Bestimmung in Gegenwart von Natriumtripolyphosphat durchgeführt, weil dieses Salz in den meisten Waschmitteln vorhanden ist. Weiterhin <sup>werden</sup> / der  $p_H$ -Wert und die Temperatur auf

109839/1549

die Waschbedingungen eingestellt. Die Bestimmung der Aktivität, die in Delft-Einheiten (DU) angegeben wird, erfolgt durch Bestimmung der Reaktion des Enzyms gegenüber Kasein. Die Stabilität wässriger Lösungen des Enzyms wird durch Bestimmung der Aktivität der Lösung in Zeitabständen bestimmt.

Zur Bestimmung der Aktivität dieses Enzyms werden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 130 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  gelöst in destilliertem Wasser auf 3000 ml.

Reagenz 2: 42 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  gelöst in destilliertem Wasser auf 3000 ml.

Reagenz 3: 63 g  $\text{NaHCO}_3$  gelöst in destilliertem Wasser auf 3000 ml.

Reagenz 4: Ein Gemisch aus 100 ml Reagenz 1, 100 ml Reagenz 2, 100 ml Reagenz 3 in 9700 ml destilliertem Wasser. Diese Lösung hat eine Härte von  $15^\circ$  (deutsche Härtegrade).

Reagenz 5: 36,34 g Tris-hydroxymethylaminomethan gelöst in Reagenz 4 auf 1000 ml.

Reagenz 6: Ein Gemisch aus 1000 g Natriumtripolyphosphat, 500 ml Reagenz 1, 500 ml Reagenz 2, 500 ml Reagenz 3 in 48,5 Liter destilliertem Wasser. Der  $\text{p}_\text{H}$ -Wert wird mit 10prozentiger Salzsäure auf 8,5 eingestellt.

Reagenz 7: 540 g Trichloressigsäure in destilliertem Wasser auf 3000 ml.

Reagenz 8: 900 g Natriumacetat  $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  gelöst in destilliertem Wasser auf 3000 ml.

Reagenz 9: 900 ml Essigsäure gelöst in destilliertem Wasser auf 3000 ml.

Reagenz 10: 2,5 ml Tween-80 gelöst in destilliertem Wasser auf 50 ml.

Reagenz 11: 100 ml Reagenz 7, 100 ml Reagenz 8, 100 ml Reagenz 9 und 4 ml Reagenz 10 werden in der angegebenen Reihenfolge miteinander vermischt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml verdünnt.

Reagenz 12: Caseinsubstratlösung. Diese Lösung wird folgendermassen hergestellt:

36,0 g Casein (Merck, für biochemische Zwecke) werden in 2,5 Liter Reagenz 4 unter Rühren gelöst. Das Gemisch wird weitere 10 Minuten gerührt, mit 300 ml Reagenz 5 versetzt und nochmals 10 Minuten gerührt. Anschliessend wird das Gemisch auf einem Wasserbad auf 70°C erwärmt und gerührt, bis die Temperatur 40°C erreicht hat. Bei dieser Temperatur wird der  $p_H$ -Wert mit 1 n Natronlauge auf 8,5 eingestellt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Gemisch mit Reagenz 4 auf 3 Liter verdünnt und die Lösung nochmals gerührt. Diese Lösung ist einen Tag haltbar, sofern sie im Kühlschrank aufbewahrt wird.

Die Proteaseaktivität wird folgendermassen bestimmt:

109839/1549

Eine abgewogene Menge eines homogenen Enzympräparats wird in einer geeigneten Menge Reagenz 6 gelöst. Der  $p_H$ -Wert dieser Lösung wird mit 1 n Natronlauge oder 1 n Salzsäure bei Raumtemperatur auf 8,5 eingestellt. Die Enzymkonzentration der Lösung ist so gewählt, dass die Aktivität der Lösung etwa 20 bis 30 Delft-Einheiten Protease/ml beträgt. Diese Lösung darf nicht länger als 2 Stunden aufbewahrt werden. Die Enzymlösung, das Casein-substrat und einige Zentrifugenröhrchen werden auf einem Wasserbad auf  $40^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  erwärmt. 1 ml der Enzymlösung wird in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Sobald diese Lösung  $40^{\circ}\text{C}$  erreicht hat, werden 5 ml der Caseinsubstratlösung in das Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit der Enzymlösung gründlich vermischt. Die Reaktionszeit beträgt genau 40 Minuten. Anschliessend werden 5 ml Reagenz 11 in das Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit der Lösung vermischt. Das Zentrifugenröhrchen wird dann 30 Minuten in ein Wasserbad eingestellt, damit die Fällung koaguliert. Anschliessend wird das Zentrifugenröhrchen 15 Minuten zentrifugiert.

Für jede Enzymlösung wird ein Blindversuch durchgeführt, indem 5 ml Reagenz 11 in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert werden, die Lösung auf  $40^{\circ}\text{C}$  erwärmt und anschliessend mit 1 ml Enzymlösung und 5 ml Caseinsubstratlösung versetzt wird. Der Inhalt des Röhrchens wird gründlich vermischt, anschliessend wird das Röhrchen 30 Minuten in ein Wasserbad eingestellt und hierauf 15 Minuten zentrifugiert. Die optische Dichte der klaren Lösung bei 275 nm gegen destilliertes Wasser wird in einem UV-Spektrophotometer bestimmt. Der Unterschied zwischen der optischen Dichte der Testlösung und der Kontrollösung ( $\Delta OD$ ) soll etwa

109839/1549

0,4 bis 0,6 betragen. Wenn der Unterschied zu hoch oder zu niedrig ist, muss ein neuer Versuch mit einer stärker verdünnten oder stärker konzentrierten Enzymlösung durchgeführt werden. Die Aktivität des Enzyms, ausgedrückt in DU/g enzymhaltigem Material, kann folgendermassen berechnet werden:

$$\Delta OD \times 11 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 4,545$$

11 bedeutet die Verdünnung der Enzymlösung durch das Substrat und das Reagenz 11. Der Verdünnungsfaktor ist der Quotient der Gesamtzahl an ml Enzymlösung und dem Gewicht der Probe in g. Die Zahl 4,545 ist ein Umwandlungsfaktor.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

#### B e i s p i e l 1

Rohe Protease, die bei der Züchtung eines *Bacillus subtilis* erhalten wurde, wird in Wasser bis zu einer Konzentration von etwa 100 000 DU/ml gelöst. Der  $p_H$ -Wert wird auf 7 eingestellt. Hierauf wird die Enzymlösung mit 10 Volumprozent einer 15 Gewichtsprozent/Volumen verdünnten Lösung der Polymerlösung G-942 (einer 24 bis 26prozentigen wässrigen Lösung eines 1 : 1 Maleinsäure-Styrol-Copolymerisats) in Wasser versetzt. Es bildet sich in geringer Menge eine Fällung. Das Gemisch wird gerührt und der  $p_H$ -Wert mit verdünnter Salzsäure auf 5 eingestellt. Hierbei bildet sich eine grosse Menge einer Fällung, die den Komplex der Protease mit dem Polymer darstellt. Die erhaltene Suspension wird 1 Stunde gerührt, die Fällung abfiltriert, in Aceton suspendiert und wieder abfiltriert. Anschliessend wird die Fällung getrocknet. Das erhaltene Protease-

109839/1549

ORIGINAL INSPECTED

präparat hat eine 2 bis 4 mal höhere Reinheit als das rohe Ausgangsmaterial.

Die unterschiedlichen Eigenschaften des Proteasekomplexes und eines herkömmlichen Proteasepräparates wird durch die folgenden Versuche erläutert.

Die Präparate werden jeweils in Wasser bis zu einer Enzymaktivität von 100 000 DU/ml gelöst. Der  $p_H$ -Wert wird durch gleichzeitige Zugabe verdünnter Natronlauge bei 9 gehalten. Dann wird eine verdünnte Lösung von Hyamin 1622 (p-tert.-Cetylphenoxyäthoxyäthyl dimethylbenzylammoniumchlorid) zugegeben. In der Lösung des erfindungsgemässen Enzymkomplexes bildet sich eine Fällung, während in der Lösung des anderen Enzympräparates keine Fällung gebildet wird. Ein Blindversuch, der mit einer verdünnten Lösung der Polymerlösung ohne das Enzym durchgeführt wurde, ergab ebenfalls eine Fällung nach Zugabe von Hyamin 1622. Daraus kann geschlossen werden, dass das Polymer einen Teil des Proteasekomplexes bildet.

Bei einem anderen Versuch wurde das erfindungsgemässe Enzympräparat sowie ein übliches Enzympräparat in einem Elektrofocussier- test nach H. Haglund, Science Tools, Bd. 14. Nr. 2, Seite 17 (1967) verglichen. Der Versuch mit dem erfindungsgemässen Enzympräparat zeigt die Bildung einer Zone fester Stoffe im niedrigeren  $p_H$ -Bereich. Diese festen Stoffe ergeben nach dem Abtrennen und Auflösen in Wasser bei hohem  $p_H$ -Wert eine Fällung mit Hyamin 1622. Das UV-Absorptionsspektrum dieser Lösung ist identisch mit dem UV-Absorptionsspektrum einer verdünnten Lösung von G-942. Der Versuch mit dem üblichen Enzympräparat

zeigt, dass eine derartige Zone fester Stoffe nicht im angegebenen  $p_H$ -Gebiet gebildet wird und die Zugabe von Hyamin 1622 keine Fällung hervorrief. Dieser Versuch zeigt ferner, dass das erfindungsgemäße Enzympräparat sich von den üblichen Enzympräparaten dadurch unterscheidet, dass das Enzym in einem Komplex mit dem Polymer gebunden ist.

Das Enzympräparat der Erfindung wird zur Herstellung eines Waschmittels folgender Zusammensetzung verwendet:

<u>Bestandteil</u>	<u>Gewichtsteile</u>
wasserfreies Natriumsulfat	54
Natriumtripolyphosphat	24
Natriumpyrophosphat	6
Natriumbicarbonat	10
Carboxymethylcellulose	2
Dialkylphenoxypoly(äthylenoxy)äthanol	4
Enzympräparat der Erfindung	2000 DU/g

Das erhaltene Waschmittel hat die gleiche Waschaktivität wie ein ähnliches Waschmittel, bei dem anstelle des Enzymkomplexes ein übliches Enzympräparat verwendet wird. Das vorstehend genannte Waschmittel mit dem Enzymkomplex ist heller und hat einen geringeren Geruch als ähnliche Waschmittel, die mit üblichen Enzympräparaten hergestellt sind.

Zur Bestimmung der Waschaktivität wird ein Waschversuch mit den nachstehend genannten Waschmitteln durchgeführt, bei denen die Bestandteile (mit Ausnahme der Enzymkomponente) die gleichen sind, wie in dem vorgenannten Waschmittel. Es werden mehrere Pro-

ben hergestellt, die 0, 250, 500, 1000 und 2000 DU/g des erfindungsgemässen Enzympräparates sowie 0, 250, 500, 1000 und 2000 DU/g eines herkömmlichen Enzympräparates enthalten. Für diesen Versuch werden Stoffproben mit den Abmessungen 5 x 5 cm des Typs EMPA-116 (Eidgenössische Material-Prüfungs- und Versuchsanstalt für Industrie, Bauwesen und Gewerbe in St. Gallen, Schweiz) verwendet, die mit Blut, Milch und Russ verschmutzt sind.

Durch Auflösen von 4 g Waschmittel in synthetischem Leitungswasser (Reagenz 4) auf 1 Liter werden Waschlaugen hergestellt. Für jede Probe wird ein 300 ml fassender Erlenmeyer-Kolben verwendet, der 250 ml der Waschlauge enthält. Die Erlenmeyer-Kolben werden bei 45°C in ein Wasserbad eingestellt. In jedem Kolben wird eine Stoffprobe eingebracht und genau 1 Stunde bei 45°C eingeweicht. Der Inhalt der Kolben wird jede 10 Minuten umgeschüttelt. Danach wird die Waschlauge abgegossen, hierauf werden 250 ml Standard-Leitungswasser zugegeben, die Erlenmeyer-Kolben werden mit einem Gummistopfen verschlossen und genau 1 Minute kräftig geschüttelt. Sämtliche Stoffproben werden hierauf in ein Becherglas gegeben und in langsam laufendem Leitungswasser mindestens 10 Minuten gespült. Danach werden die Stoffproben entnommen, zwischen saubere Handtücher gelegt und 16 bis 18 Stunden ohne Druck getrocknet. Die Ergebnisse der Reinigungswirkung werden mit einem Elrepho-Remissionsapparat unter Verwendung von Magnesiumoxid als Bezugssubstanz bestimmt. Es wird ein Filter Nr. 1 verwendet. Die Remissionen werden in Prozent der Remission einer vollständig sauberen Stoffprobe berechnet. In Tabelle I sind die Ergebnisse zusammengestellt.

109839/1549

ORIGINAL INSPECTED

Tabelle I

DU/g	Probe mit dem Enzym- präparat der Erfin- dung	Probe mit herkömm- lichem Enzympräpa- rat
0	45	45
250	58	59
500	66	66
1000	69	70
2000	75	73

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Remissionswerte nicht signifikant verschieden sind. Daraus ist zu entnehmen, dass die Waschaktivität der Proben mit dem erfindungsgemässen Enzymkomplex die gleiche ist wie die der Proben mit dem herkömmlichen Enzympräparat.

B e i s p i e l 2

Ein konzentriertes Kulturfiltrat, das bei der Züchtung eines *Bacillus subtilis* erhalten wurde, und das einen  $p_H$ -Wert von 7 und eine Aktivität von etwa 100 000 DU/ml hat, wird in einer Menge von 10 Volumprozent mit einer 20gewichtsprozentigen/Volumen verdünnten Lösung der 25prozentigen Polymerlösung G-942 in Wasser versetzt. Es bildet sich in geringer Menge eine Fällung. Der  $p_H$ -Wert wird mit verdünnter Schwefelsäure unter Rühren auf 4 eingestellt. Hierbei bildet sich eine grosse Menge einer fällung, die den Protease-Polymerkomplex darstellt. Die Fällung wird gemäss Beispiel 1 abgetrennt und aufgearbeitet.

Das erhaltene Enzympräparat hat eine 2 bis 4 mal höhere Reinheit als die nach üblichen Methoden erhaltenen Präparate. Die Ausbeute beträgt 90 % der Theorie, bezogen auf die Proteaseaktivität

109839/1549

der eingesetzten Lösung.

Aus diesem Enzympräparat wird ein Waschmittel hergestellt, das die gleichen Wascheigenschaften hat, wie ein ähnliches Waschmittel, das eine vergleichbare Menge eines herkömmlichen Enzympräparats enthält.

### B e i s p i e l 3

Es werden verschiedene Enzympräparate durch Zusatz einer wässrigen Lösung des zu untersuchenden Polymers zu einer Proteaselösung mit einer Aktivität von 80 000 bis 100 000 DU/ml und Einstellen des  $p_H$ -Wertes auf 4 hergestellt. Die erhaltenen Fällungen werden abfiltriert oder abgeschleudert und gemäss Beispiel 1 gewaschen und getrocknet. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengestellt.

100000/1040

2109881 Juni 197

- 22 -

Tabelle II

Polymer	Mgw.	Dosis, %(1)	Ausbeute, %	Aktivität, DU/g
Polyacrylsäure		0,5	38	3 520 000
Acrylsäure-Styrol-Copolymerisat 2 : 1	21 000	0,5	67	4 740 000
Polymethacrylsäure	50 000	0,75	75	4 560 000
Methacrylsäure-Styrol-Copolymerisat 2 : 1	26 000	1,25	66	4 480 000
Maleinsäure-Styrol-Copolymerisat 1 : 1	21 000	0,5	83	4 220 000
Maleinsäure-Styrol-Copolymerisat 1 : 1	44 000	0,25	83	4 200 000
Maleinsäure-Styrol-Copolymerisat 3 : 2	31 000	0,5	79	3 850 000
Äthylen-Maleinsäure-Copolymerisat 1 : 1, vernetzt	44 000	0,16	57	4 860 000
Äthylen-Maleinsäure-Copolymerisat 1 : 1		0,15	55	4 700 000
1 : 1 Gemisch aus Äthylen-Maleinsäure-Copolymerisat 1 : 1 und Maleinsäure-Styrol-Copolymerisat 1 : 1		0,5	98	3 320 000
Maleinsäure-Styrol-Copolymerisat 1 : 1		0,5	95	4 320 000
Maleinsäure-mcnobutylester-Methylvinyläther-Copolymerisat 1 : 1		0,6	30	3 780 000

(1) % Gewicht/Volumen, bezogen auf den Trockensubstanzgehalt.

Beispiel 4

Der Einfluss der Menge der Polymerlösung G-942 wurde anhand von Fällungsversuchen mit einer Bacillus subtilis Proteaselösung untersucht, die etwa 70 000 DU/ml enthält. Die Fällungsausbeuten werden durch Auflösen der feuchten Fällungen und Bestimmen der proteolytischen Aktivität bestimmt. Die Fällungen werden gemäß Beispiel 1 gewaschen und getrocknet. Der Polymergehalt der

Trockenpräparate wird bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III

Dosis, % der kommerziellen G-942-Lösung	Fällungsausbeute, %	G-942-Polymergehalt in trockenem Präparat, %
0,25	31	10
0,5	63	
1	80	
2	85	18
4	89	25,5
8	89	
16	77	

Aus der Tabelle geht hervor, dass man eine optimale Fällungsausbeute bei einer Dosis von 4 bis 8 % der kommerziellen G-942-Lösung erhält.

B e i s p i e l 5

Maleinsäure-Styrol-Copolymerisatkomplex von Alcalase

Eine Lösung von Alcalase (ein von *Bacillus subtilis* erzeugtes Enzym) wird mit 5 Volumprozent einer 1 : 5 verdünnten Lösung der Polymerlösung G-942 versetzt. Der  $p_H$ -Wert wird mit 4 n Essigsäure auf 4,2 eingestellt. Die Fällung wird abfiltriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Das Trockenpräparat hat eine Aktivität von 2 420 000 DU/g. Ausbeute 92 % der Theorie.

B e i s p i e l 6

Maleinsäure-Styrol-Copolymerisatkomplex einer Protease

800 ml eines Kulturfiltrats von *Bacillus alkalophilus*, das etwa 28 000 DU/ml enthält, werden mit 16 ml einer 1 : 5 verdünnt.

109839/1549

ten Lösung der Polymerlösung G-942 versetzt. Der  $p_H$ -Wert wird mit 4 n Essigsäure auf 4,2 eingestellt. Die gebildete Fällung wird abzentrifugiert, mit einem 1:1-Gemisch von Methanol und Aceton gewaschen und getrocknet. Die proteolytische Aktivität beträgt 10 900 000 DU/g. Ausbeute 86 % der Theorie.

#### B e i s p i e l 7

Maleinsäure-Styrol-Copolymerisatkomplex von Amylase

200 ml einer Lösung von Amylase, die mit einem *Bacillus subtilis* erzeugt wurde, werden mit 20 ml einer 1 : 5 verdünnten Lösung der Polymerlösung von G-942 versetzt. Der  $p_H$ -Wert wird mit 1 n Salzsäure auf 4,0 eingestellt. Die gebildete Fällung wird abzentrifugiert und in wenig Wasser suspendiert. Der  $p_H$ -Wert der Suspension wird 1 n Natronlauge auf 7 eingestellt und die Suspension wird mit der dreifachen Volumenmenge Aceton versetzt. Die Fällung wird abfiltriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Das Produkt hat 81 % der ursprünglichen Amylaseaktivität.

#### B e i s p i e l 8

Maleinsäure-Styrol-Copolymerisatkomplex einer Lipase

20 ml einer Lösung, die 600 mg eines Lipasepräparates aus der Kulturbrühe von *Candida cylindracea* nov. sp. enthält, und einen  $p_H$ -Wert von 4,5 aufweist, werden mit 2 ml einer 1 : 5 verdünnten Lösung der Polymerlösung von G-942 versetzt. Der  $p_H$ -Wert wird mit 1 n Salzsäure auf 3,5 eingestellt. Die Fällung wird abzentrifugiert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Es werden 263 mg eines Produktes mit etwa 90 % der ursprünglichen Lipaseaktivität erhalten.

109839/1549

B e i s p i e l 9

Maleinsäure-Styrol-Copolymerisatkomplex einer Lactase

40 ml einer Lösung, die 1 % eines Lactasepräparates aus Hefe und 0,5 % Gelatine enthält, werden mit 4,4 ml einer 1 : 5 verdünnten Lösung der Polymerlösung G-942 versetzt. Der  $p_H$ -Wert wird auf 4,0 eingestellt. Die gebildete Fällung enthält 61 % der ursprünglichen Lactaseaktivität. Ein Blindversuch ohne Zusatz der Polymerlösung G-942 ergibt beim Ansäuern ebenfalls eine Fällung, die jedoch weniger als 1 % der ursprünglichen Lactaseaktivität enthält.

B e i s p i e l 10

Maleinsäure-Styrol-Copolymerisatkomplex einer Alkoholdehydrogenase<sup>nase</sup>

Aus autolysierter Bäckerhefe wird ein Alkoholdehydrogenasefiltrat erhalten. 120 ml dieses Filtrats mit einem  $p_H$ -Wert von 7 werden mit 4 Volumprozent einer 1 : 5 verdünnten Lösung der Polymerlösung von G-942 versetzt. Der  $p_H$ -Wert wird mit 4 n Essigsäure auf 4,5 eingestellt. Die gebildete Fällung wird abzentrifugiert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Es werden 3,3 g Trockenprodukt mit 55 % der ursprünglichen Aktivität des Hefefiltrats erhalten.

B e i s p i e l 11

Es werden die toxischen Effekte von zwei Proben von proteolytischen Enzympräparaten bestimmt. Die eine Probe ist ein in herkömmlicher Weise durch Ausfällung mit einem organischen Lösungsmittel hergestelltes Enzympräparat. Diese Probe wird mit dem gemäß Beispiel 1 hergestellten Enzympräparat d r Er-

findung verglichen. Die Proben werden mit Natriumsulfat auf eine proteolytische Aktivität von etwa 300 000 DU/g eingestellt, in Wasser gelöst und mittels einer Sprühvorrichtung in einem Behälter verteilt. Jeder Behälter enthält 5 männliche Mäuse mit einem Körpergewicht von 24 g, erhalten von Carworth Europe, Alconbury, Huntingdon, England. Die Enzymkonzentration in der Luft beträgt 5000 DU/Liter im ersten Versuch. Die Behandlungsdauer beträgt 5 Stunden. Danach werden die Tiere 7 Tage beobachtet. Es werden folgende Ergebnisse erhalten. Bei dem herkömmlichen Produkt starben 2 Tiere. Bei dem Enzympräparat der Erfindung erfolgten keine Todesfälle.

In einem zweiten Versuch wurden 8 Ratten (4 männliche und 4 weibliche von der gleichen Farm) einer Enzymaktivität von 800 DU/Liter während 68 Stunden ausgesetzt. Nach dreitägiger Beobachtung werden folgende Ergebnisse erhalten:  
Mit dem herkömmlichen Produkt starben 6 Tiere, mit dem Enzympräparat der Erfindung erfolgten keine Todesfälle.

In einem dritten Versuch werden 8 Ratten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 5 Stunden einer Enzymaktivität von 800 DU/Liter ausgesetzt. Die Tiere werden während 14 Tagen beobachtet. Mit dem herkömmlichen Produkt starb ein Tier, während mit dem Enzympräparat der Erfindung keine Todesfälle beobachtet wurden.

109838/1548

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Enzympräparat, enthaltend einen Komplex aus einem Enzym und einem in wässrig-alkalischer Lösung löslichen Polymer mit einer unverzweigten oder verzweigten C-C-Kette mit Carboxylgruppen als Substituenten und mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von mindestens 10 000, wobei das Polymer gegebenenfalls als weitere Substituenten gegebenenfalls substituierte Kohlenwasserstoffreste enthalten kann und die C-C-Kette und bzw. oder die Kohlenwasserstoffreste gegebenenfalls durch Heteroatome, vorzugsweise Sauerstoffatome, unterbrochen sein können.

2. Enzympräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer  $-CHXCY(COOH)-$ Gruppen enthält, in denen X ein Wasserstoffatom oder eine Carboxylgruppe und Y ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe bedeutet, und das Polymer mindestens ein weiteres Comonomer einpolymerisiert enthält, und wobei die Carboxylgruppen teilweise mit niederen aliphatischen Alkoholen verestert oder mit Ammoniak oder Aminen teilweise in die entsprechenden Säureamide überführt ist.

3. Enzympräparat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer sich von Acrylsäure oder Methacrylsäure oder von einem Copolymerisat von Acrylsäure, Methacrylsäure oder Maleinsäure mit Styrol, Äthylen oder Methylvinyläther ableitet.

4. Enzympräparat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer lediglich Kohlenwasserstoffreste und Carboxylgruppen als Substituenten der C-C-Kette trägt.

5. Enzympräparat nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine der Struktureinheiten des Polymers Maleinsäure ist.
6. Enzympräparat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass eine der Struktureinheiten ein Monoaryläthylenrest ist.
7. Enzympräparat nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Monoaryläthyleneinheit Styrol ist.
8. Enzympräparat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ein Maleinsäure-Styrol-Copolymerisat ist.
9. Enzympräparat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Molverhältnis der Maleinsäureeinheiten zu den Styrol-einheiten im Copolymerisat etwa 3 : 1 bis 1 : 3 beträgt.
10. Enzympräparat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Molverhältnis der Maleinsäureeinheiten zu den Styrol-einheiten im Copolymerisat etwa 3 : 2 bis 2 : 3 beträgt.
11. Enzympräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Durchschnittsmolekulargewicht des Polymers mindestens 20 000 beträgt.
12. Enzympräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym eine Protease ist, die im Gemisch mit einem anderen Enzym, insbesondere Amylase oder Lipase, vorliegt.
13. Enzympräparat nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease durch eine Bacillusart erzeugt worden ist.

109839/1549

ORIGINAL INSPECTED

14. Enzympräparat nach Anspruch 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass es mit Metallionen oder Reagenzien, die mit den freien Carboxylgruppen des Polymers reagieren können, umgesetzt worden ist.

15. Enzympräparat nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es mit Aluminium-, Eisen-, Chrom- oder Zirkoniumionen umgesetzt worden ist.

16. Verfahren zur Herstellung des Enzympräparats nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man eine wässrige Lösung eines Enzyms mit einer wässrigen Lösung eines Polymers mit einer unverzweigten oder verzweigten C-C-Kette mit Carboxylgruppen als Substituenten und mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von mindestens 10 000 zusammenbringt, wobei das Polymer gegebenenfalls als weitere Substituenten gegebenenfalls substituierte Kohlenwasserstoffreste enthalten kann, und die C-C-Kette und bzw. oder die Kohlenwasserstoffreste gegebenenfalls durch Heteroatome, vorzugsweise Sauerstoffatome, unterbrochen sein können, und dass man den erhaltenen Enzymkomplex gegebenenfalls mit einer Lösung behandelt, die Metallionen oder Reagenzien enthält, die mit den freien Carboxylgruppen des Polymers reagieren.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man vor oder nach dem Vermischen der Enzymlösung mit der Polymerlösung den  $p_H$ -Wert auf etwa 2 bis etwa 9 einstellt und die gebildete Fällung abtrennt.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man den  $p_H$ -Wert auf etwa 2 bis etwa 6 einstellt.

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Fällung abfiltriert und den gebildeten Enzymkomplex wäscht und trocknet.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man den Enzymkomplex mit einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Aceton oder Äthanol, wäscht.

21. Verfahren nach Anspruch 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass man den Enzymkomplex mit einer Aluminium-, Eisen-, Chrom- oder Zirkoniumionen enthaltenden Lösung behandelt.

~~22. Waschmittel, enthaltend ein Enzympräparat nach Anspruch 1 bis 15 zusammen mit mindestens einer waschaktiven Substanz.~~

*ersetzt durch den am 26.3.71  
eingegangenen Anspruch 22. ~~Stk~~  
28.5.71*

2109881

*eingegangen am 26.03.71  
für den ursprünglichen  
Anspruch 22. Siehe  
28.5.71*

DR. ELISABETH JUNG  
DR. VOLKER VOSSIUS  
DR. JÖRGEN SCHIRDEWAHN  
PATENTANWÄLTE  
8 München 23, Clemensstr. 20  
Telefon: 345067

F 933 C

P 21 09 881.7

31

23.4.1971

Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N.V.

Neuer Patentanspruch 22

Verwendung des Enzympräparates nach Anspruch 1 bis 15 in Wasch-  
mitteln.

109839/1549